

大豆蛋白的中红外和近红外光谱研究^{*}

江 艳 武培怡^{**}

(聚合物分子工程教育部重点实验室 复旦大学高分子科学系 上海 200433)

摘 要 大豆蛋白在各领域的应用已得到广泛的关注,因此大豆蛋白及其改性材料在结构性能方面的研究显得越来越重要。中红外光谱(mid-infrared spectroscopy, MIR)和近红外光谱(near-infrared spectroscopy, NIR)正是对蛋白质进行定性定量分析的有力手段。中红外光谱可以有效地分析大豆蛋白在溶液和薄膜中的二级结构以及大豆衍生材料内蛋白质的结构变化情况。近红外光谱则在蛋白质定量分析方面有着独特的优势。本文介绍了运用这两种光谱技术进行研究的一些工作,这些实例表明了中红外和近红外光谱在大豆蛋白研究领域的重要应用价值。

关键词 中红外光谱技术 近红外光谱技术 大豆蛋白

中图分类号: O657.33; Q51 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2009)04-0705-10

Study of Soy Protein by Mid-Infrared Spectroscopy and Near-Infrared Spectroscopy

Jiang Yan Wu Peiyi^{**}

(The Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Extensive attention has been given to the application of soy protein in various fields. Thus, studies on the structures and properties of soy protein and related modified materials have become more and more important. Mid-infrared spectroscopy (MIR) and near-infrared spectroscopy (NIR) are powerful analytical tools for qualitative and quantitative analysis of protein. MIR spectroscopy can be utilized to analyze the secondary structures of soy protein in solution and membrane and the changes in structure of the protein in derived materials effectively, while NIR spectroscopy owns unique advantages in the quantitative analysis of protein. In this review, some research works conducted with these two spectral techniques are introduced. All the examples show the great values in the applications of mid-infrared and near-infrared spectroscopy in the field of soy protein.

Key words mid-infrared spectroscopy (MIR); near-infrared spectroscopy (NIR); soy protein

Contents

- | | |
|--|--|
| 1 Application of MIR spectroscopy in the analysis of soy protein structure | 1.2 Study of soy protein materials by MIR spectroscopy |
| 1.1 Study of soy protein solution and film by MIR spectroscopy | 2 Application of NIR spectroscopy in the analysis of soy protein |
| | 3 Summary |

收稿: 2008 年 5 月, 收修改稿: 2008 年 6 月

* 国家杰出青年科学基金项目 (No. 20425415)、国家自然科学基金项目 (No. 20490220, 20573022, 20774022)、国家重点基础研究专项基金项目 (No. 2005CB623800) 资助

** 通讯联系人 e-mail: peiyiwu@fudan.edu.cn

大豆蛋白因其低廉的价格、广泛的来源和优良的生物降解性^[1]而成为了石油提取产品的一种有效的替代物,在上世纪 30 年代就曾被使用^[2-4]。现在,作为一种环境友好材料,大豆蛋白材料已广泛应用于粘结剂^[5,6]、食品^[7]、健康护理^[8]、塑料^[9]和纺织品纤维^[10]等方面。本文将从中红外和近红外光谱两方面介绍对大豆蛋白进行研究的工作进展。

1 中红外光谱在大豆蛋白结构研究方面的应用

大豆中的蛋白质根据分子量的不同可以分为 2S、7S、11S 和 15S 等多种,其中最主要的蛋白是大豆 11S 球蛋白,分子量为 360kDa。它由 6 个亚基组成,每个亚基都包含了一个碱性的 γ -多肽和一个酸性的 β -多肽,两者由一个二硫键相连,形成 β 亚基^[11]。大豆球蛋白曾作为一种功能性材料用于凝胶、加工中的乳化剂或发泡剂^[12,13],而后其成膜能力被用来开发包装材料^[14,15]。因此很有必要深入研究实际应用中 pH 值、温度、离子强度等因素对其结构和性能的影响。

红外光谱作为一种分析分子结构的有效手段,具有所需样品少、操作简便、测量速度快、易测定蛋白质的瞬间结构、不受光散射和荧光的影响等优点,是研究中必不可少的一个工具。以红外光谱研究大豆蛋白结构的工作大致可以分成两类。一类是直接对大豆中的蛋白质进行结构的分析,用分峰、去卷积和二阶导数等方法对蛋白质的二级结构进行定性和半定量的研究。这些工作一般是将大豆蛋白制成溶液或薄膜,由于制样的方法相对简单,因此这类工作开展得相对比较早。近年来更多的工作是侧重于将大豆产品通过一些共混、改性的手段制成大豆蛋白材料,然后用红外光谱研究这些材料中蛋白质的结构变化。这就是大豆蛋白的另一类红外研究工作,这类研究主要分析蛋白质的结构及其与共混物或添加剂之间发生的相互作用,将材料的性能和其内部结构相联系。下面将分别就这两类工作举几个实例加以介绍。

1.1 大豆蛋白溶液和薄膜的中红外研究

大豆球蛋白的结构在很大程度上受到所处的水环境影响,Abbott 等^[16]研究了不同含水量对结构造成的影响,采用的是红外透射光谱。作者对于采集到的谱图进行了差谱、去卷积化、二阶导数和分峰等后续处理,旨在从中获取更多的结构信息。

图 1 即为去卷积化的谱图与单一组分的谱图相

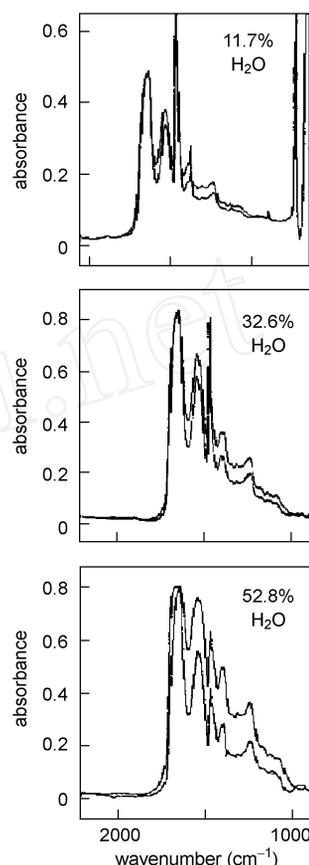


图 1 大豆球蛋白扣除水的谱图前后的红外谱图^[16]

Fig. 1 Spectra of glycinin before (upper) and after (lower) bound water subtraction^[16]

减后的差谱,其中单一组分的谱图根据 Koenig 等的比例法^[17]得到。差谱中 amide I 和 amide II 的谱带强度比接近 1.5。将得到的差谱以 Gaussian 峰形进行分峰拟合,再根据峰面积和相应归属,可以计算出不同含水率情况下蛋白质中各结构所占的比例,结果列于表 1 中。

表 1 由红外谱图得到的不同含水率下大豆球蛋白的二级结构

Table 1 Glycinin secondary structure by FTIR at various water contents

%H ₂ O	percentage of structure			
	α -helix	β -sheet	turns	unordered
2.6	25.0	29.8	34.5	10.7
11.7	22.5	32.5	33.6	11.4
14.4	22.5	32.7	35.1	9.6
16.4	21.6	32.2	35.5	10.7
28.2	27.4	26.7	34.7	11.2
32.6	25.0	29.1	34.7	11.2
37.6	26.0	28.5	34.0	11.5
38.5	23.3	32.5	33.7	10.5
52.8	23.9	28.4	37.4	10.3

表1的结果说明,即使没有温度的变化,蛋白质的二级结构也可能发生变化,导致这种变化的原因正是蛋白质的含水量。

从以上结果来看,大豆球蛋白在固体状态和溶液状态下具有相似的结构。但在不加热情况下,含水率的变化会在一定程度上影响各二级结构在蛋白质中所占的比例。

Subirade等^[18]也对大豆球蛋白的溶液状态和固体状态进行了研究,不过他们是将大豆球蛋白制成薄膜,并包含加热步骤。大豆11S球蛋白的薄膜是通过两步法得到的:首先对蛋白质进行加热使其变性,使蛋白质用于形成分子内氢键和静电相互作用的官能团暴露出来,以便形成分子间的相互作用;第二步是表面脱水,使未折叠的蛋白质相互接触,生成分子间相互作用,并最终形成网络结构。

对于大豆球蛋白的溶液,Subirade等采用透射方法,将溶液夹在盐片中测定红外光谱。图2是蛋白质溶液在中性、碱性和添加增塑剂乙二醇3种不同成膜条件下得到的谱图。为了获得更多的信息,amide I 区间也进行了去卷积处理。

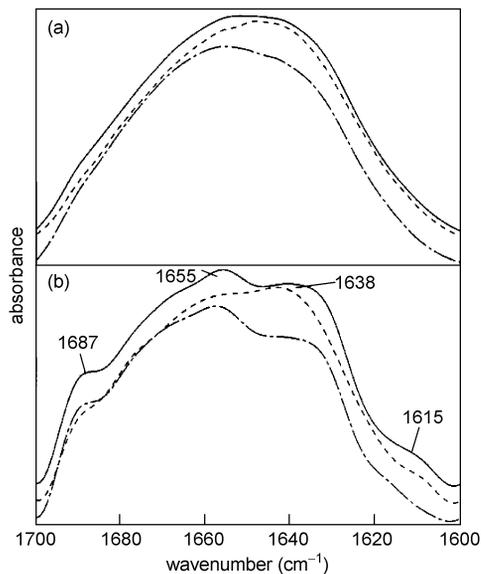


图2 大豆球蛋白溶液在中性、碱性和成膜条件下得到的原始(a)和去卷积处理(b)的红外谱图^[18]

Fig.2 Original (a) and deconvoluted (b) infrared spectra of soy glycinin in (—) aqueous solution (pH=7), (---) alkaline conditions (pH=10) and (- - -) film-forming conditions (pH=10 and presence of ethylene glycol)^[18]

Amide I 区间主要包含了C=O和C—N的伸缩振动,对于蛋白质二级结构的变化非常敏感。从图中可见,中性条件下得到的原始谱图仅在1648cm⁻¹

处出现了一个很宽的包峰,其中包括了几个交叠的组分。去卷积之后,这一区域出现了至少5个谱带:其中,1638和1687cm⁻¹是 β -sheet结构所对应的酰胺谱带^[19,20];1655cm⁻¹来源于 β -helix或无规线团结构;1670cm⁻¹归属于 β -turn结构^[21];而1615cm⁻¹处谱带则由蛋白质聚集后形成的分子间 β -sheet结构产生^[22]。根据进一步的定量分析,作者发现大豆球蛋白主要是以 β -sheet结构存在的。这一结果和之前Abbott等总结的结果有很大的不同,这些差异可能来源于样品状态的差异,也可能源自分析方法和不同图谱处理方法的选择^[23]。

在碱性溶液中,蛋白质的amide I 谱带发生了明显的位移,移到了1641cm⁻¹处。这一现象在去卷积后的谱图中更为明显,中性条件下1638cm⁻¹处的谱带位移到了1641cm⁻¹,并伴随着归属于 β -sheet结构的1637和1687cm⁻¹两处谱带强度的下降。由此,作者推断出1641cm⁻¹谱带来源于无规结构,并从定量分析结果和核磁共振谱^[24]得到了确认。这说明碱性条件使蛋白质发生了一定程度的变性。

图2还考察了增塑剂对蛋白质的影响。乙二醇等增塑剂可以有效地提高蛋白质链的活动性,减少分子间氢键的形成,从而改善膜的弹性和延展性。 β -sheet结构和无规线团结构在添加增塑剂的情况下会变成 β -helix结构,并且这种现象在许多以醇类作为蛋白质溶剂的体系内经常出现^[25]。这是由两个原因造成的:一是醇类的偶极矩大,容易破坏多肽原有的分子内氢键而以醇羟基与多肽形成氢键;另一个是醇类的介电常数较小,可以减小蛋白质的疏水相互作用而改变蛋白质的结构。

制膜过程需要对大豆球蛋白进行加热,图3给出了蛋白质在加热后的谱图变化。温度对大豆球蛋白的结构产生了非常大的影响。比较图3中70时的红外谱图和图2中碱性条件下(不含增塑剂)的谱图,可以发现两者惊人地一致,这说明了热致变性产生的中间产物和碱性环境下蛋白质变性产生的中间产物相同。

成膜过程的第二步是表面脱水,脱水后的薄膜以ATR-FTIR方法采集光谱,这里不再详述。

Subirade等还研究了增塑剂和分子取向对蛋白质力学性能的影响。不同的增塑剂制得的膜在结构上略有差异,分子间形成氢键的数量和强度是影响膜力学性能的一个原因。同时,偏正ATR-FTIR的结果证实以乙二醇为增塑剂得到的大豆球蛋白膜的 β -sheet结构是高度取向的,这种结构也会影响膜的

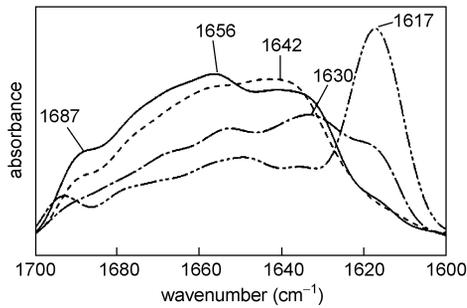


图 3 大豆球蛋白在成膜条件、加热至 70 °C、冷却至 20 °C 以及在膜状态下得到的去卷积处理的红外谱图^[18]

Fig. 3 Deconvoluted infrared spectra of glycinin (—) in the film-forming conditions (pH = 10 and ethylene glycol), (---) after heating for 1h at 70 °C, (- · - ·) after cooling to 20 °C and (· · · ·) in the film state^[18]

性能。

除了大豆球蛋白,Subirade 小组还对 β -乳球蛋白进行了类似的红外研究^[26],同样是分别观察加热以及脱水后蛋白质溶液和膜的结构变化,另外还分析了增塑剂二甘醇(DEG)的影响。不过在这一工作中,他们采用了重水体系,有效地避免了水峰的干扰,这一点从图 4 中可以得到证实。由于得到的谱图质量比较好,采用分峰的方法就可以比较方便地得到各交叠谱带的峰位置和相应归属。使用重水和氘代方法是研究蛋白质结构的一种常用且有效的手段。

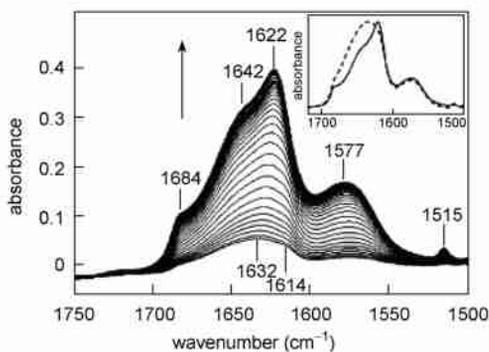


图 4 β -乳球蛋白在 amide I 区间的 ATR 红外谱图^[26]

Fig. 4 ATR spectra in the amide I region of a film-forming β -lg solution (10% w/v in D₂O, after heating 30min at 80 °C, β -lg/DEG weight ratio of 1:1) as a function of time during dehydration^[26]

L'Hocine 等^[23]在前人的工作基础之上,研究了 pH 值和离子强度对大豆球蛋白二级结构的影响。为了避免水峰的干扰,他们采用了重水体系。研究

发现,大豆球蛋白是以 β -sheet 结构为主的,这一点和 Subirade 等的研究结果相似。图 5 给出了处于不同离子强度环境中的大豆球蛋白在改变环境 pH 值后得到的红外谱图,并将其与重水的谱图进行比较。在酸性环境中 (pH = 2.2 和 pH = 2.8),蛋白质解开折叠,形成了熔融的“globule”状态。但是在离子强度较低时,pH = 2.8 和 pH = 2.2 的情况又略有不同,前者要比后者更有序,维持了更多的原有二级结构。

大豆球蛋白的等电点为 pH = 5.67,该值与图 5 中的 pH = 6.1 的环境接近,所以在这一环境中,离子强度会对蛋白质的二级结构产生很大的影响,直接影响到各结构的组成。一旦 pH 值达到 7.2,离子强度对二级结构的影响就微乎其微了。由以上工作可以发现,通过改变环境的离子强度和 pH 值,可以改变其二级结构,并且 pH 值在其中起主要的作用。和 L'Hocine 不同,Bao 等^[27]虽然也研究了离子对大豆蛋白的影响,但是他们观察的是蛋白质在水解过程中与钙离子的结合现象。研究发现蛋白质与钙离子的结合能力与 3 个因素有关:首先是蛋白质水解酶;其次是蛋白质的分子量;最后是蛋白质的羧基数量。红外光谱的研究发现蛋白质的 amide I 谱带在结合了钙离子之后会发生红移,说明蛋白质的羧基团可能与钙离子形成了相互作用,在一定程度上解释了第三个因素影响两者结合能力的原因。

Martin 小组^[28]以红外反射吸收光谱 (IRRAS) 研究了 β -乳球蛋白、 β -酪蛋白和大豆球蛋白 3 者在气-液表面吸附时二级结构的变化情况。其中大豆球蛋白在酸性和中性条件下的情况有一定的差异:酸性条件下,蛋白质在界面发生了团聚,生成了分子间的 β -sheet 结构,意味着蛋白质网络形成;中性条件下则没有这种结构生成。

他们还比较了酸性的大豆蛋白在气-液表面吸附和自由延展两种条件下施加压力后的情况(图 6)。两种条件下得到的红外谱图都出现了归属于 β -sheet 结构的 1630cm⁻¹ 谱带,但是受压后的延展蛋白质层的谱带强度要更强些,说明层内发生了更多的聚集,形成了较多的分子间 β -sheet 结构;而吸附蛋白质层则没有发生这种变化。要对这类处于气-液界面上的蛋白质体系进行结构研究,红外反射吸收光谱 (IRRAS) 是一种很好的分析手段,在有些研究中还能提供分子取向方面的信息。

Zhao 等^[29]研究了用两种方法萃取的大豆球蛋白的二级结构。他们分别用水溶液和 AOT 反胶束萃取了大豆蛋白中的 7S 和 11S 球蛋白,然后用二

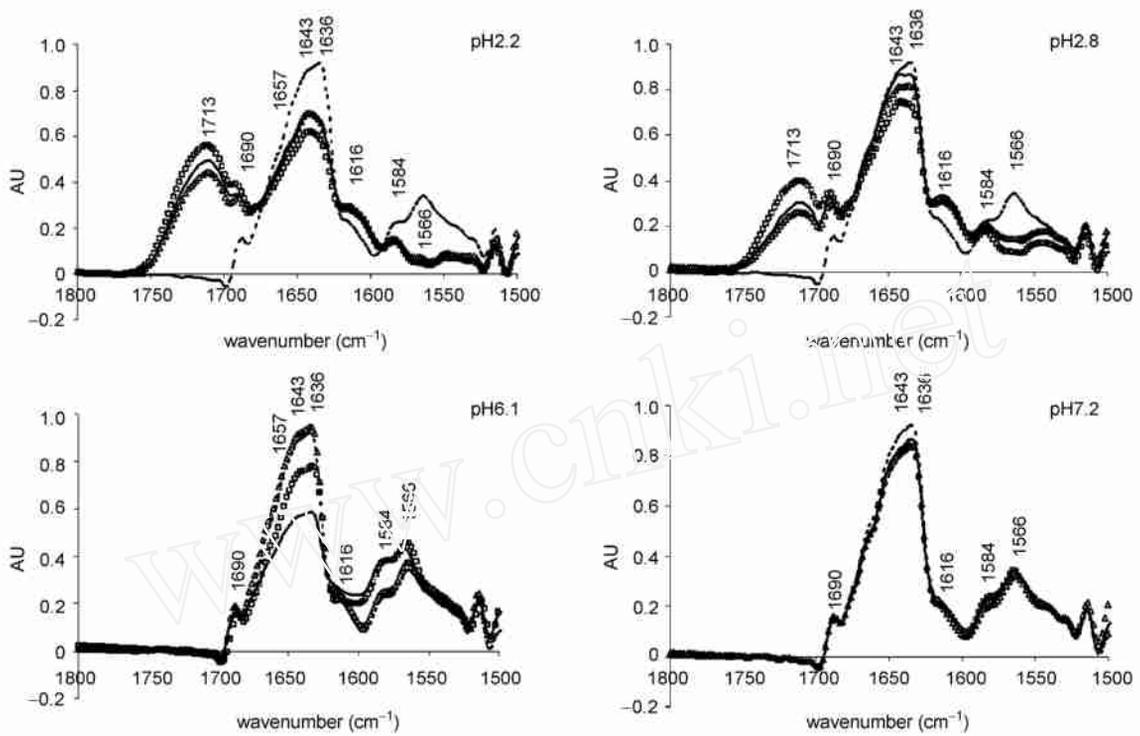


图 5 不同离子强度的大豆球蛋白在不同酸碱环境中的红外谱图以及重水的红外谱图^[23]

Fig.5 FTIR spectra of purified glycinin with different ionic strength at various pH values and D₂O with no pH and ionic strength adjustments^[23]

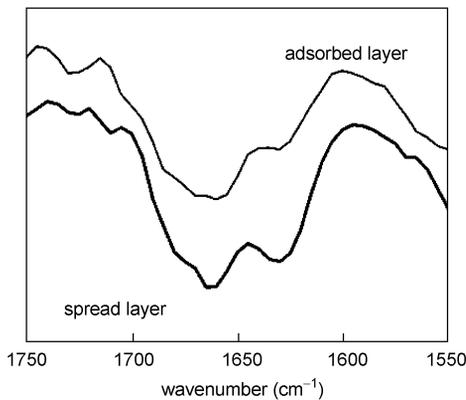


图 6 酸性环境中表面吸附和延展两种条件下得到的大豆球蛋白的红外反射吸收谱图^[28]

Fig.6 IRRAS spectrum of an adsorbed glycinin layer and a spread glycinin layer (pH=3)^[28]

阶导数的方法分析得到透射光谱,发现用反胶束萃取得到的球蛋白的 amide 谱带和用水溶液萃取的蛋白质谱带相比都发生了一定的位移。通过谱带强度进行进一步的定量分析,作者发现 7S 球蛋白在用反胶束萃取时的无序程度增加,而 α -helix、 β -sheet 和 β -turn 3 种二级结构的比例都有所减小。11S 球蛋白则与 7S 的情况略有不同,虽然反胶束萃取也会导致

其无序结构增加,但是 α -helix 和 β -sheet 两种二级结构的比例却没有发生变化,仅是 β -turn 结构的减少。萃取方法的不同会导致蛋白质二级结构的差异,这一点为蛋白质结构的可调控提供了一些启发。

除了以上介绍大豆球蛋白的工作之外,还有不少以从大豆中提取的其他成分为研究对象的红外光谱研究,包括 Shih 等对晚期胚胎富集 (LEA) 蛋白 GmPM16 在不同溶剂中结构的研究^[30],Boatright 等对大豆分离蛋白中提取的 *trans*-3,5-二甲氧基二苯乙烯结构的红外研究^[31],Forato 等对 13 种球蛋白以 KBr 压片法采集红外光谱进行研究^[32]等,这里不再赘述。

从以上的实例不难发现,目前对于大豆蛋白结构的研究所采用的方法和手段是相当丰富的,不过在对谱图进行处理时所用的分峰、去卷积等数学手段可能伴随着涉及参数过多的缺点。这一问题也许可以通过使用二维相关光谱技术得以解决,该方法已在许多蛋白质结构研究工作中展现出良好的分析价值。

1.2 大豆蛋白材料的中红外研究

由大豆产品制成的材料一般是通过压膜法和螺杆挤出制备的^[33,34],有时候还会添加一些增塑剂,如

丙三醇或水。由这种方法制成的材料虽然生物降解性不错^[33,34],但是往往在力学性能和防水性能上差强人意^[35]。这两方面的性能可以通过 3 种方法提高:第一种是将大豆产品与其他的天然或合成可降解高分子共混,这些高分子包括淀粉、藻酸钠^[36]、水发泡的聚氨酯泡沫塑料^[37]、聚乙烯醇^[10]、酸酐支化的聚酯^[38]等;第二种方法是用一些有机或无机试剂,如乙酸酐^[39]、丁二酸酐^[40]、盐酸胍^[41]、表氯醇^[9]、尿素^[42]和硫酸锌^[9]等,对大豆产品进行修饰。第三种方法是在大豆产品中引入一些可交联的像戊二醛^[43]和二醛淀粉^[44]之类组分,形成交联网络。

用这 3 种方法对由大豆产品制成的材料进行改性的过程中,材料的内部结构有可能会发生一些改变,这些变化可以通过红外光谱进行研究。近年来, Soldi 小组^[45-47]、Netravali 小组^[48,49]和 Zhang 小组^[50-60]都在大豆蛋白材料性能方面进行了相当多的研究。

Soldi 小组将大豆分离蛋白和一些物质混合制成膜,观察其在热降解过程中的变化。红外光谱在这一过程中被用来分析热降解产物,为反应机理提供证据。样品一般分成两类:一类是升到一定温度后再降至室温的固体残渣;另一类是升温过程中产生的气体产物。

图 7 是将大豆分离蛋白(SPI)和十二烷基硫酸钠(SDS)按 63/37 的质量比混合后得到的复合物和纯 SPI 在不同温度热降解后得到的固体残渣的红外谱图^[47]。

常温下,SPI 和 SPI/SDS 膜的 amide_I、amide_{II} 和 amide_{III} 谱带都有较强的吸收峰,两种样品的差别主要在于后者在饱和碳氢伸缩振动区间的强度更大,并且在 1730cm^{-1} 处出现了一个新的羰基峰,意味着 SDS 的引入使蛋白质的结构发生了变化。

当温度升高到 200°C ,所有的吸收峰强度都发生了明显的下降。SPI 的 amide_I 谱带在 1680cm^{-1} 处出现了一个肩峰, 1630cm^{-1} 处仍为最大值,这一现象归属于蛋白质的反平行链折叠结构^[61]。 275°C 是 SPI/SDS 膜的最大降解温度,在这一温度下,C—H 伸缩振动和 N—H 弯曲振动相对于 amide_I 谱带都发生了下降。而 amide_I 谱带向高波数方向发生了位移,说明其结构发生了一定的调整,包括肽键的分离。因此,SDS 和 SPI 都在该温度下开始发生热降解。温度进一步升高到 350°C ,纯 SPI 的 C—H 伸缩振动和变形振动谱带仍然存在,说明热降解首先发生在 C—N、C(O)—NH、C(O)—NH₂ 和 —NH₂ 等强度

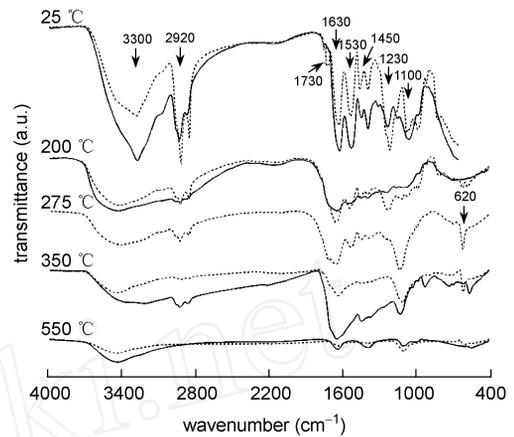


图 7 SPI 和质量比为 63/37 的 SPI/SDS 膜在不同温度下热降解得到的固体残渣的红外谱图^[47]

Fig. 7 FTIR spectra for solid residues of SPI (solid line) and SPI/SDS-63/37 (dotted line) films during thermal degradation at different temperature^[47]

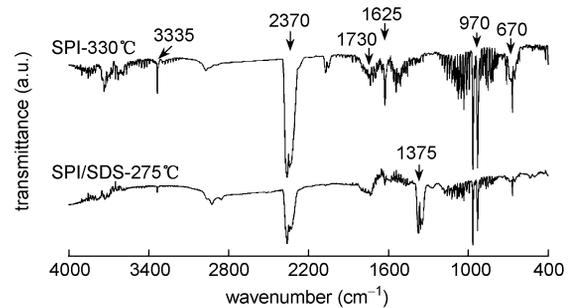


图 8 SPI 和质量比为 63/37 的 SPI/SDS 膜在降解速度最快的温度下得到的固体残渣的红外谱图^[61]

Fig. 8 FTIR spectra for evolved gas products of SPI and SPI/SDS-63/37 films at the temperature of maximum degradation rate^[61]

较弱的键。这一说法在图 8 的热降解气体产物的红外光谱中得到了证实。

图 8 中 SPI 热降解气体产物是在 330°C 下测得,SPI/SDS 的相应产物则是在 275°C 时得到,SDS 的加入降低了最快降解速度所对应的温度。对纯 SPI 而言,气体产物中主要包含了 CO_2 、CO、羰基、 NH_3 和饱和碳氢基团。 1625cm^{-1} 处的双键和归属于 $=\text{CH}_2$ 面外弯曲振动的 670cm^{-1} 谱带说明了 SPI 的热降解过程中生成了不饱和的碳氢基团。而在 SPI/SDS 的热降解气体产物中,除了 CO_2 、 NH_3 和饱和碳氢外,并没有出现双键、羰基或 CO,只是在 1375cm^{-1} 处出现了 SDS 的热降解产生的 $-\text{CH}_3$ 基团,说明 SDS 的热降解是伴随着 SPI 的热降解同时发生的。

Soldi 小组的工作主要是侧重于大豆蛋白复合

物的热力学性质研究,Netravali 等则不仅关心改性后的大豆蛋白材料在热力学方面的表现,而且对其力学性能和表面形貌等方面都进行了相关的测试。在他们的工作中,红外光谱同样是一种表征复合物内结构的手段,只不过由于 Netravali 采用的是衰减全反射(ATR)红外光谱,因此他们研究的仅是材料表面的结构信息。

Netravali 小组^[49]用硬脂酸取代丙三醇作为增塑剂,考察硬脂酸对 SPI 树脂性能的影响。丙三醇在 $800 \rightarrow 150\text{cm}^{-1}$ 区域有 5 个特征峰,当它作为增塑剂和 SPI 一起固化成 SPI 树脂后,这 5 个特征峰依旧保留,如图 9 所示,说明丙三醇在树脂中是以自由形式存在的,因此随着时间的推移,非常容易从树脂中逸出,影响树脂的性能。当用硬脂酸取代丙三醇作为增塑剂时,硬脂酸原先在 1710cm^{-1} 处的强吸收峰^[62]消失了。Netravali 等认为这是由于硬脂酸的羧基团和大豆蛋白分子形成了酰胺键,而新形成基团的吸收峰却被大豆蛋白原有的 amide 谱带所掩盖,因此 1710cm^{-1} 处的谱带消失却没有在其他地方出现新的吸收峰。

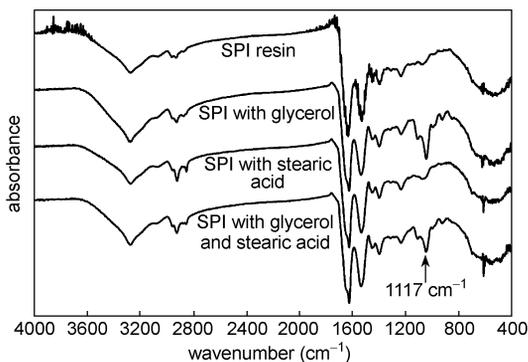


图 9 纯 SPI 树脂和分别含有 30% 丙三醇和 25% 硬脂酸的 SPI 树脂和同时含有两种增塑剂的 SPI 树脂的红外谱图^[49]

Fig. 9 ATR-FTIR spectra of SPI resin with 0% glycerol and 0% stearic acid, SPI resin with 30% glycerol, SPI resin with 25% stearic acid, and SPI resin with 30% glycerol and 25% stearic acid^[49]

硬脂酸和大豆蛋白之间的反应使得硬脂酸可以作为一种内增塑剂存在于树脂之内,保证了树脂性能不随时间而变化。同时,树脂内未反应的硬脂酸则可以作为外增塑剂,起到和丙三醇同样的作用。

在这一工作中,SPI 树脂的厚度太厚以至于 Netravali 小组采用 ATR-FTIR 来观察其结构。但在有些情况下,树脂的内部和表面可能存在着明显的

差异,仅根据表面没有出现硬脂酸的某些吸收峰就断定其与 SPI 发生了反应未免有失偏颇,其结论仍需要其他的实验结果加以佐证。

Zhang 小组在大豆蛋白材料方面进行了很多的研究,不仅包括大豆分离蛋白(SPI)^[51-56],也包括豆粕(SD)^[50,57,60]。采用的改性手段更是多种多样,既有简单的共混,也有在蛋白中引入多官能团物质使其交联。限于篇幅,这里仅就后者举一实例介绍。

将大豆蛋白与荷负电的水发泡聚氨酯(WPU)和乙二醇二缩水甘油醚(EGDE)混合后浇膜固化,热压得到交联的 SPI/WPU 片状样品^[54],其中 WPU 为增塑剂,EGDE 为交联剂。SPI 和 WPU 的质量比固定为 3:20,EGDE 则在不同的样品中含量不同,分别用 E0、E1、E2、E3、E4、E5 和 E6 代表 EGDE 含量从 0 增加到 6wt% 的情况。图 10 给出了 EGDE 含量不同时的复合物以及纯 SPI 和 WPU 的红外谱图。

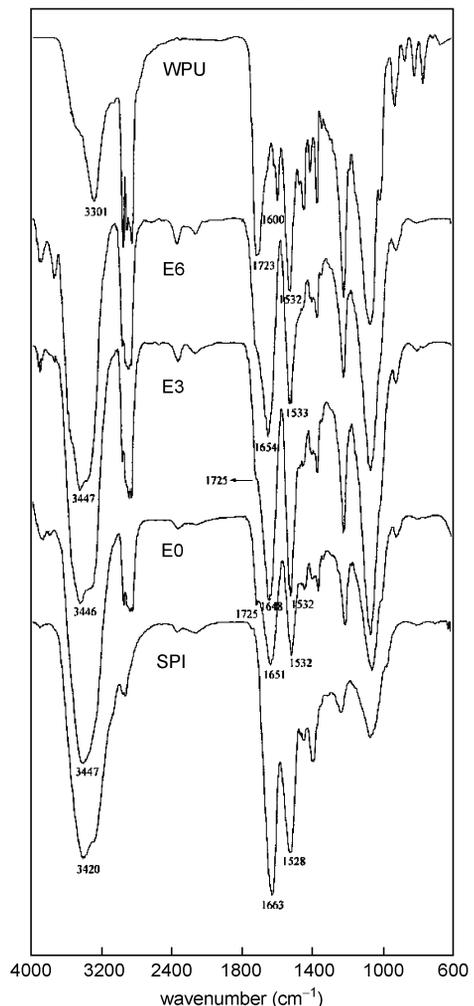


图 10 WPU、E0、E3、E6 和 SPI 的红外谱图^[54]

Fig. 10 FTIR spectra of the WPU, E0, E3, E6, and SPI sheets^[54]

EO 中 SPI 和 WPU 混合后, SPI 在 $1\ 663\text{cm}^{-1}$ 处形成氢键的羰基谱带位移到了 $1\ 651\text{cm}^{-1}$ 处, 说明 SPI 和 WPU 间形成了更强的氢键, 并且这一变化趋势并不随 EGDE 含量的增加而变化。相反地, $1\ 725\text{cm}^{-1}$ 处归属于 WPU 的羰基谱带却随着 EGDE 含量的增加强度减弱。这是由于 EGDE 的环氧基团与 WPU 的氨基发生了反应, 意味着体系内形成了由 EGDE 连结而成的网络结构。红外光谱在这里证实了交联结构的存在。

总的说来, 红外光谱在大豆蛋白和其他物质共混体系中的应用比较单一, 主要就是用于体系结构的确定, 方法包括了透射和 ATR-FTIR。虽然其在特定体系的分析中所占的比例并不大, 但是其重要性却不容忽视。很多情况下, 红外结果给机理的推测提供了依据, 因此除了以上介绍的 3 个课题组, 还涌现了大量利用红外光谱研究大豆蛋白材料方面的工作。

2 近红外光谱在大豆蛋白研究中的应用

近红外 (near infrared, NIR) 光谱的谱区范围是 $12\ 500\text{--}4\ 000\text{cm}^{-1}$, 是一项可以实现无损检测的测试技术。其主要包括了 XH ($X = \text{C}, \text{O}, \text{N}, \dots$) 等含氢基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团振动光谱的倍频及合频吸收^[63, 64], 所以谱带宽, 重叠较严重。此外, 较弱的吸收信号和复杂的信息解析过程也限制了它的发展和运用, 直至近年来计算机与化学统计学软件的发展, 才使近红外光谱逐渐发展为一种定性定量分析的有效手段。

近红外光谱作为一种无损检测的手段, 具有测样耗时短、操作便捷的优点, 因此在定量检测领域有着广泛的应用。它是一种间接的相对分析, 通过测定大量具有代表性的标准样本的光谱、组成或性质数据, 在计算机中建立数学模型以反映样本群体的分布规律 (称为定标), 再将未知样品与数学模型或定标方程进行关联和比较, 从而实现定量分析的目的。

近红外光谱区域包含了许多谱带的合频和倍频, 结构复杂, 谱带交叠严重, 所以在进行定量分析时, 往往需要对谱图进行一定的数学处理, 如一阶或二阶导数处理、多元散射校正 (MSC)、归一化等, 来解决基线漂移和谱带强度弱难以分辨的问题。第二步是在处理后的谱图基础上建立数学模型, 常用的方法有主成分回归 (PCR)、偏最小二乘 (PLS) 回归、多元线性回归 (MLR) 和人工神经网络 (ANN) 法等。

建好的数学模型要通过样品的数据来进行验证, 一般使用相关系数 (R)、定标集标准差 (SEC)、相对分析误差 (RPD) 和预测校正标准误差 (RMSEP) 等参数对预测结果进行评估。

Kovalenko 等^[65] 对大豆中的氨基酸组分进行了近红外光谱的研究, 通过偏最小二乘回归和人工神经网络等方法建立了数学模型, 根据定量预测的结果对不同近红外光谱仪的差别进行了分析, 证实了在不同的仪器上采集的光谱应该用不同的数学模型来定量分析。

Pazdernick 等^[66] 将不同条件下得到的大豆进行研磨, 然后用近红外反射光谱对其进行表征, 得到的谱图分别进行 $\log(1/R)$ 、一阶导数和二阶导数 3 种不同的数学处理, 然后根据偏最小二乘回归法得到了 3 个定标方程。进一步的研究发现, 提纯脱脂后的 11S 蛋白亚基与粗蛋白含量具有正相关性, 而与油脂含量具有负相关性。其后, Bennett 小组^[67] 也对研磨过的大豆中的蛋白质和油脂含量进行了近红外定量分析, 不过他们将注意力放在同一植株不同位置上得到的大豆在组分含量上的差异。

Delwiche 小组在 Pazdernick 等人工作的启发下试图通过测定整颗大豆的近红外透射谱图来确定其中的蛋白质含量^[68] 和磷含量^[69]。他们设计了一个装置用于固定整颗大豆, 如图 11 所示。但是研究结果表明, 近红外透射谱图无法对大豆中的蛋白质含量进行准确预测^[68]; 而对于大豆中的磷含量, 透射方法虽然得到了和反射方法类似的信息, 但是仍需要其它的手段加以佐证^[69]。

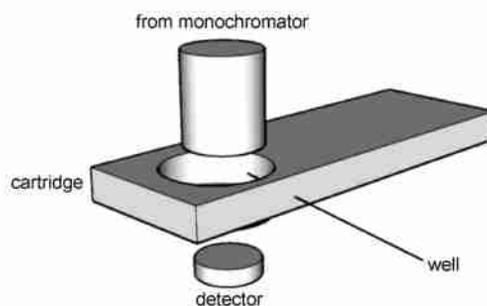
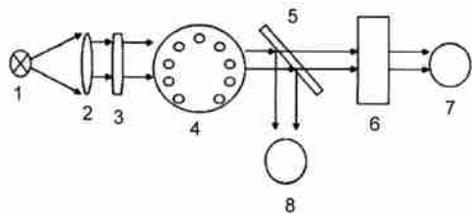


图 11 用于整颗大豆近红外透射表征的装置^[69]

Fig. 11 Schematic of single-bean transmittance apparatus^[69]

朱文静等^[70] 同样使用近红外光谱仪对整颗大豆中的蛋白质含量进行了测定, 不过他们是在仪器上进行了一些改进, 采用了滤光片型近红外光谱分析仪, 可在多波长下进行透过率的测定, 如图 12 所示。经过对 38 个不同品种的大豆进行含量分析, 发

现用这种仪器可以实现对整颗大豆的蛋白质含量进行预测,并且精度与凯氏定氮法基本相同。



1. halogen lamp, 2. lens, 3. visible filter, 4. filter wheel,
5. spectroscopy, 6. sample cell, 7. photodetector a, 8. photodetector b

图12 滤光片型近红外光谱仪器示意图^[70]

Fig. 12 Schematic of filter-type NIR spectrometer^[70]

以近红外光谱对大豆蛋白进行研究工作目前主要局限在定量分析上,这方面类似的工作还有一些^[71-75],这里就不一一介绍了。相对于其它蛋白质,将近红外光谱用于大豆蛋白结构分析的工作却很少,但随着仪器性能的改善和分析手段的发展,这方面的研究是大有可为的。

3 结语

作为一种来源广泛、廉价且可生物降解的材料,大豆蛋白无疑具有很大的应用价值和研究潜力。本综述从中红外和近红外光谱两方面探讨了两者在大豆蛋白结构和含量测定方面的工作。

中红外光谱对于蛋白质二级结构的判定有很多的应用实例,但这些工作的结论并不一致,很多因素都可能造成这种结果上的差异,这方面的工作仍有待深入。

近红外光谱则主要用于大豆组分的定量分析,通过不同的数学处理手段和模型定标,可以对大豆中蛋白质、油脂等组分含量进行分析和预测。在这一过程中,除了各种数学参数和测定方法会左右定量结果,仪器设备也可能会对结果的可行性和可靠性产生影响。

参考文献

- [1] Kumar R, Choudhary V, Mishra S, et al. *Ind. Crop. Prod.*, 2002, 16: 155—172
- [2] Brother G H, Mc Kinney L L. *Ind. Eng. Chem.*, 1939, 31: 84—87
- [3] Brother G H, Mc Kinney L L. *Ind. Eng. Chem.*, 1938, 30: 1236—1240
- [4] Smith A K, Circle S J, Brother G H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 60: 1316—1320
- [5] Wang W H, Li X P, Zhang X Q. *Pigm. Resin Technol.*, 2008, 37: 93—97
- [6] Hettiarachchy N S, Kalapathy U, Myers D J. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1995, 72: 1461—1464
- [7] Chin K B, Keeton J T, Longnecker M T, et al. *Meat Sci.*, 1999, 53: 45—57
- [8] Garcia M C, Marina M L, Laborda F, et al. *Food Chem.*, 1998, 62: 325—331
- [9] Zhang J, Mungara P, Jane J. *Polymer*, 2001, 42: 2569—2578
- [10] Zhang Y, Chasenzadeh S, Kotliar A M, et al. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1999, 71: 11—19
- [11] Badley R A, Atkinson D, Hauser H, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 412: 214—228
- [12] Peng I C, Quass D W, Dayton W R, et al. *Cereal Chem.*, 1984, 61: 480—490
- [13] Kinsella J E. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1979, 56: 242—258
- [14] Brandenburg A H, Weller C L, Testin R F. *J. Food Sci.*, 1993, 58: 1086—1089
- [15] Gennadios A, Brandenburg A H, Weller C L, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41: 1835—1839
- [16] Abbott T P, Nabetani H, Sessa D J, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44: 2220—2224
- [17] Koenig J L, Desposito L, Antoon M K. *Appl. Spectrosc.*, 1977, 31: 292—295
- [18] Subirade M, Kelly I, Gueguen J, et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, 23: 241—249
- [19] Arrondo J L R, Muga A, Castresana J, et al. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1993, 59: 23—56
- [20] Surewicz W K, Mantsch H H, Chapman D. *Biochemistry*, 1993, 32: 389—394
- [21] Pezolet M, Bonenfant S, Dousseau F, et al. *FEBS Letters*, 1992, 299: 247—250
- [22] Carrier D, Mantsch H H, Wong P T T. *Biopolymers*, 1990, 29: 837—844
- [23] L'Hocine L, Boye J I, Jouve S. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55: 5819—5826
- [24] Kakalis L T, Baianu I C. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37: 1222—1228
- [25] Nelson J W, Kallenbach N R. *Biochemistry*, 1989, 28: 5256—5261
- [26] Lefevre T, Subirade M, Pezolet M. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 3209—3219
- [27] Bao X L, Lü Y, Yang B C, et al. *J. Food Sci.*, 2008, 73: C117—C121
- [28] Martin A H, Meinders M B J, Bos M A, et al. *Langmuir*, 2003, 19: 2922—2928
- [29] Zhao X Y, Chen F S, Xue W T, et al. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22: 568—575
- [30] Shih M D, Lin S D, Hsieh J S, et al. *Plant Mol. Biol.*, 2004, 56: 689—703
- [31] Boatright W L, St Pyrek J, Song J, et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, 75: 1651—1655
- [32] Forato L A, Bernardes R, Colnago L A. *Anal. Biochem.*, 1998, 259: 136—141

- [33] Wang S, Sue H J, Jane J. *Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry*, 1996, A33: 557—569
- [34] Mo X Q, Sun X S, Wang Y Q. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1999, 73: 2595—2602
- [35] Zhong Z K, Sun X Z S. *Polymer*, 2001, 42: 6961—6969
- [36] Shih F F. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, 71: 1281—1285
- [37] Chang L C, Xue Y, Hsieh F H. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2001, 81: 2027—2035
- [38] John J, Bhattacharya M. *Polym. Int.*, 1999, 48: 1165—1172
- [39] Foulk J A, Bunn J M. *Ind. Crop. Prod.*, 2001, 14: 11—22
- [40] El-Adawy T A. *Food Chem.*, 2000, 70: 83—91
- [41] Zhong Z K, Sun X S. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, 78: 1063—1070
- [42] Mo X Q, Sun X Z. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2001, 78: 867—872
- [43] Park S K, Bae D H, Rhee K C. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2000, 77: 879—883
- [44] Rhim J W, Gennadios A, Weller C L, et al. *Ind. Crop. Prod.*, 1998, 8: 195—203
- [45] Schmidt V, Soldi V. *Polym. Degrad. Stab.*, 2006, 91: 3124—3130
- [46] Soares R M D, Scremin F F, Soldi V. *Macromol. Symp.*, 2005, 229: 258—265
- [47] Schmidt V, Giacomelli C, Soldi V. *Polym. Degrad. Stab.*, 2005, 87: 25—31
- [48] Lodha P, Netravali A N. *Polym. Degrad. Stab.*, 2005, 87: 465—477
- [49] Lodha P, Netravali A N. *Ind. Crop. Prod.*, 2005, 21: 49—64
- [50] Chen Y, Zhang L, Deng R, et al. *Macromol. Mater. Eng.*, 2007, 292: 484—494
- [51] Chen Y, Zhang L N. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2004, 94: 748—757
- [52] Chen P, Zhang L N, Peng S P, et al. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, 101: 334—341
- [53] Chen P, Zhang L. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 1700—1706
- [54] Wang N G, Zhang L N, Gu J M. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2005, 95: 465—473
- [55] Chen Y, Zhang L N, Gu J M, et al. *J. Membr. Sci.*, 2004, 241: 393—402
- [56] Wang N G, Zhang L. *Polym. Int.*, 2005, 54: 233—239
- [57] Chen Y, Zhang L N, Lu Y S, et al. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2003, 90: 3790—3796
- [58] Deng R, Chen Y, Chen P, et al. *Polym. Degrad. Stab.*, 2006, 91: 2189—2197
- [59] Chen Y, Zhang L N, Du L B. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2003, 42: 6786—6794
- [60] Zhang L, Chen P, Huang J, et al. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2003, 88: 422—427
- [61] Moharram M A, Abdelnour K N, Abdelraof G. *Polym. Degrad. Stab.*, 1994, 45: 429—434
- [62] National Institute of Standards and Technology. *Chemistry WebBook*. [2008-04]. <http://webbook.nist.gov/chemistry>
- [63] Ozaki Y, Siesler H W, Kawata S, et al. *Near-Infrared Spectroscopy*. Germany Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 1—7
- [64] Wang J, Sowa M G, Ahmed M K, et al. *J. Phys. Chem.*, 1994, 98: 4748—4755
- [65] Kovalenko I V, Rippke G R, Hurburgh C R. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54: 3485—3491
- [66] Pazdernik D L, Plehn S J, Halgerson J L, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44: 2278—2281
- [67] Bennett J O, Krishnan A H, Wiebold W J, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51: 6882—6886
- [68] Delwiche S R, Bordesimo L O, Panthee D R, et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2007, 84: 1107—1115
- [69] Delwiche S R, Bordesimo L O, Scaboo A M, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54: 6951—6956
- [70] 朱文静 (Zhu W J), 陈斌 (Chen B), 邹贤勇 (Zou X Y). *现代仪器 (Mod. Instrum.)*, 2007, (6): 44—46
- [71] Naeve S L, Proulx R A, Hulke B S, et al. *Agron. J.*, 2008, 100: 231—234
- [72] Franco D, Nunez M J, Pinelo M, et al. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, 222: 443—450
- [73] Maraboli A, Cattaneo T M P, Gangiacomo R. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 2002, 10: 63—69
- [74] Morimoto S, McClure W F, Stanfield D L. *Appl. Spectrosc.*, 2001, 55: 182—189
- [75] Fontaine J, Horr J, Schirmer B. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49: 57—66